



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Tesi di Laurea:

METODI COMPUTAZIONALI PER LO STUDIO DELL' HDAC6

Relatori: Prof. Adriano Martinelli
Dott.sa Gabriella Ortore
Dott.sa Margherita Lapillo

Candidato: Giulio Scarpellini
(mat. n° 480273)

Settore Scientifico Disciplinare: **CHIM-08**

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

ABSTRACT

Le HDAC o istone deacetilasi sono un gruppo di enzimi deputati a rimuovere i gruppi acetile dai residui di ϵ -N-acetil lisina delle estremità amino terminali delle proteine istoniche, permettendo a queste proteine di avvolgere il DNA più strettamente e quindi bloccare il processo di trascrizione genica. Nell'essere umano esistono 18 differenti isoforme di HDAC divise in due gruppi: quelle dipendenti dallo zinco (Zn^{2+}) e quelle dipendenti dalla nicotinammide adenina dinucleotide (NAD^+) chiamate più comunemente *sirtuine*. Le HDAC zinco dipendenti sono ulteriormente suddivise in classi e sottoclassi: la classe Ia cui appartengono le HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8; la classe IIa che contiene le HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9 e la classe IIb che comprende le HDAC6 e HDAC10; infine la classe IV la cui unica rappresentante è l'HDAC11.

Il mio lavoro di tesi volge l'attenzione verso l'HDAC6. Questa è una proteina citoplasmatica che regola importanti processi biologici, che si basano sulla rete dei microtubuli, includendo la migrazione cellulare e la degradazione delle proteine mal ripiegate. Avendo queste molteplici funzioni, le HDAC sono coinvolte in svariate malattie come ad esempio tumori, malattie neurodegenerative quali le malattie di Parkinson, Alzheimer e Huntington, oltre che alle ciliopatie. Lo scopo di questa tesi è la preparazione attraverso tecniche di chimica computazionale di un modello tridimensionale dell'HDAC6 soddisfacente, cioè l'ottenimento di un esemplare il più possibile corrispondente alla proteina presente in natura.

Il modello è stato sviluppato, mediante la tecnica dell'Homology Modelling, partendo dalla sequenza amminoacidica primaria dell'HDAC6 umana reperibile dal database UNIPROT. Come template, sono state utilizzate le strutture cristallografiche delle proteine che dalla ricerca con il software pBLAST sono risultate essere dotate del più alto valore di identità di sequenza amminoacidica con il target; in particolare, sono stati utilizzati i cristalli delle HDAC4, 7 e 8 caratterizzati da una percentuale di identità totale compresa tra il 28% e il 47%.

Il modello, dopo 13 ns di dinamica, è stato utilizzato come target per effettuare il docking di ligandi riportati in letteratura e dotati di una certa attività inibitoria sull'HDAC6. È stata infatti creata una piccola libreria di 123 composti raggruppando le molecole, sia attive che inattive, presenti in letteratura e testate con procedure analoghe di screening biologico.

La scelta del software di docking è stata effettuata applicando una procedura di *cross*

docking a 19 complessi ligando-proteina delle varie isoforma di HDAC (1,2,4,7, e 8) reperibili dal Protein Data Bank. Delle quattro scoring function del software GOLD testate, la ASP è risultata quella più adeguata a questo studio e pertanto è stata applicata al docking dei ligandi noti. .

I risultati del docking sono stati poi usati per creare un modello 3D-QSAR, usando il programma FLAP, per valutare la capacità predittiva del docking stesso rispetto all'attività riportata in letteratura per i ligandi.

Tutte le possibili interazioni degli inibitori con il sito di legame sono state attentamente valutate, in particolare quelle sperimentalmente note e necessarie per l'attività catalitica.

Durante il lavoro di Tesi, sono state rese note le prime coordinate dell'enzima HDAC6 ottenute tramite cristallografia a RX. Dal confronto fra il modello ottenuto tramite la nostra procedura computazionale e quello sperimentale è emersa una similitudine conformazionale eccellente, pari a un RMSD di 0,88 Å.

La validazione del protocollo è stata quindi di natura sperimentale. Dalle simulazioni di dinamica molecolare sono emersi interessanti spunti di studio sul meccanismo catalitico, e dal docking degli inibitori noti sono state evinte ulteriori informazioni sulla loro relazione struttura-attività.

Nuovi studi, di natura biochimica e farmaceutica, potranno scaturire da questo lavoro computazionale, la cui validità resta eccellentemente confermata dagli studi cristallografici -purtroppo – concomitanti.